

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian berjenis eksperimental. Proses fraksinasi yang digunakan adalah fraksinasi bertingkat. Metode ekstraksi yang dipilih adalah metode maserasi. Sedangkan untuk pengujian antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode difusi cakram.

4.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah umbi segar tanaman *Eleutherine palmifolia* yang diperoleh dari kota Palangkaraya, Kalimantan Tengah dan telah dikeringkan dan dideterminasi di UPT Materia Medika Batu, Jawa Timur.

4.3 Lokasi Penelitian

Proses ekstraksi dan fraksinasi dilaksanakan di Laboratorium Sintesis dan pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan bulan Juni 2019.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- | | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| 1) Timbangan analitik | 8) Pipet tetes |
| 2) Gelas ukur | 9) Sudip |
| 3) Cawan Porselen | 10) <i>Rotary evaporator vacuum</i> |
| 4) Toples kaca | 11) Chamber |
| 5) Penyaring Buchner | 12) Pinset |
| 6) Batang pengaduk | |
| 7) Oven | |

- | | |
|-----------------------------|------------------------|
| 13) Sinar UV | 20) Pipet Volume |
| 14) Kertas saring | 21) Inkubator |
| 15) Penjepit | 22) <i>Autoclave</i> |
| 16) Plat KLT | 23) <i>Micro pipet</i> |
| 17) Pipa kapiler | 24) <i>Hot Plate</i> |
| 18) <i>Laminar Air Flow</i> | 25) Kawat ose |
| 19) Cawan Petri | 26) Bunsen |

Bahan- bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- | | |
|--|---|
| 1) Serbuk umbi umbi
<i>Eleutherine palmifolia</i>
(Palangkaraya) | 6) Disk cakram antibiotik
<i>Ciprofloxacin</i> (Oxoid) |
| 2) Pelarut Etil Asetat technical
grade (Bratachem) | 7) Disk cakram kosong (Oxoid) |
| 3) <i>Mueller Nutrien Agar</i>
(Oxoid) | 8) Asam sulfat 10%
(Bratacem) |
| 4) <i>Mueller Nutrien Broth</i>
(Oxoid) | 9) Larutan KOH 10%
(MERCK) |
| 5) Aquades steril technical
grade (Bratachem) | 10) Pereaksi Dragendroff
(MERCK) |
| | 11) FeCl 1% (Bratacem) |
| | 12) NaCl 10% (Bratacem) |
| | 13) Tween 80 10% (MERCK) |

4.6 Variabel Penelitian

4.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* dengan konsentrasi 80 mg/ml , 120 mg/ml dan 160 mg/ml pada bakteri *Shigella dysenteriae*.

4.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dihasilkan oleh senyawa uji yang ditandai dengan adanya daerah bening disekitar senyawa uji yang ada pada media agar sebagai parameter untuk menentukan hambat minimum senyawa dari fraksi etil asetat.

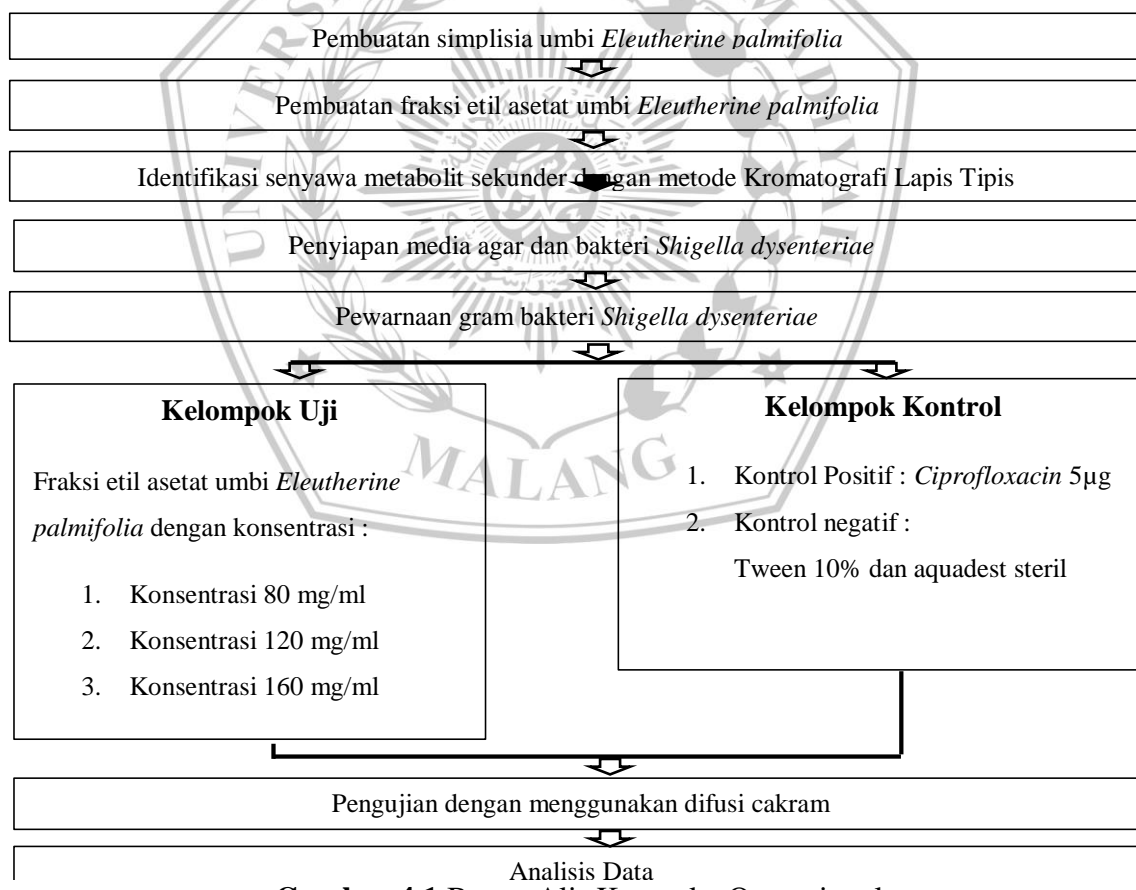
4.7 Metode Penelitian

4.7.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini bersifat eksperimental yang mempunyai tujuan mengetahui aktivitas antibakteri untuk zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* dari fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* secara *in vitro* dengan menggunakan metode difusi cakram. Pada penelitian yang dilakukan menggunakan dua perlakuan yakni kelompok kontrol dan kelompok uji. Terdapat beberapa tahap dalam penelitian ini, di antaranya :

- 1) Preparasi Sampel (Bahan Uji)
- 2) Penarikan komponen senyawa/Ekstraksi
- 3) Pemisahan komponen senyawa dengan metode KLT
- 4) Pengujian antibakteri dengan metode difusi cakram

4.7.2 Kerangka Operasional



Gambar 4.1 Bagan Alir Kerangka Operasional

4.8 Prosedur Kerja

4.8.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan harus dilakukan sterilisasi terlebih dahulu yang tujuannya untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan metode sterilisasi panas basah dan sterilisasi panas kering.

4.8.1.1 Sterilisasi Panas Basah

Sterilisasi panas basah dilakukan dengan menggunakan alat yang dinamakan autoklaf dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C . Alat-alat yang di sterilkan dengan metode sterilisasi panas basah yaitu : pipet tetes, erlenmeyer, gelas ukur, media *Mueller Hinton Agar (MHA)* dan media *Mueller Hinton Broth (MHB)*.

4.8.1.2 Sterilisasi Panas Kering

Sterilisasi panas kering terdapat dua metode yaitu dengan oven dan pemijaran (dengan api langsung).

1) Sterilisasi dengan oven

Sterilisasi dengan oven pemanas efektif untuk alat-alat gelas, dilakukan selama 1 jam pada suhu 160°C . Alat yang disterilkan dengan metode ini yaitu peralatan yang tidak berskala seperti tabung reaksi, pipet dan cawan petri (Lukas, 2006).

2) Sterilisasi dengan pemijaran

Alat-alat yang disterilkan dengan metode pemijaran meliputi : pinset, mulut tabung biakan, spatel, batang pengaduk dan ose.

4.8.2 Preparasi Sampel (Bahan Uji)

Bahan uji yang digunakan pada praktikum ini adalah umbi *Eleutherine palmifolia*. Langkah pertama umbi dibersihkan, dipotong tipis-tipis kemudian dikeringkan dengan cara di angin-anginkan pada suhu ruang sebisa mungkin untuk menghindari dari sinar matahari secara langsung. Setelah kering, dilakukan penyerbukan dengan mesin penggiling sampai di dapatkan serbuk halus umbi *Eleutherine palmifolia*. Selanjutnya, diayak menggunakan alat *shieve shaker* dengan derajat kehalusan tertentu (Depkes RI, 2009).

Kemudian dilakukan pengujian kadar air untuk mengetahui jumlah air yang kemungkinan masih terdapat dalam ekstrak. Sebanyak 2 g ekstrak kering di masukkan dalam alat *moisture analyzer*, lakukan pengujian dengan replikasi 3 kali.

4.8.3 Proses Ekstraksi Bahan Uji dengan Pelarut Etil Asetat

Pada penelitian ini proses ekstraksi yang dilakukan yaitu dengan metode maserasi bertingkat dengan menggunakan 3 macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda yaitu pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol.

Dalam pembuatan ekstraknya digunakan serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* total sebanyak 3,2 kilogram yang diekstraksi dengan pelarut etil asetat. Pada proses ekstraksi terbagi menjadi 2 sesi, sesi pertama dengan serbuk sebanyak 1,2 kilogram dan sesi kedua dengan serbuk sebanyak 2 kilogram menggunakan metode maserasi perendaman selama 24 jam. Pada sesi pertama sebagai berikut :

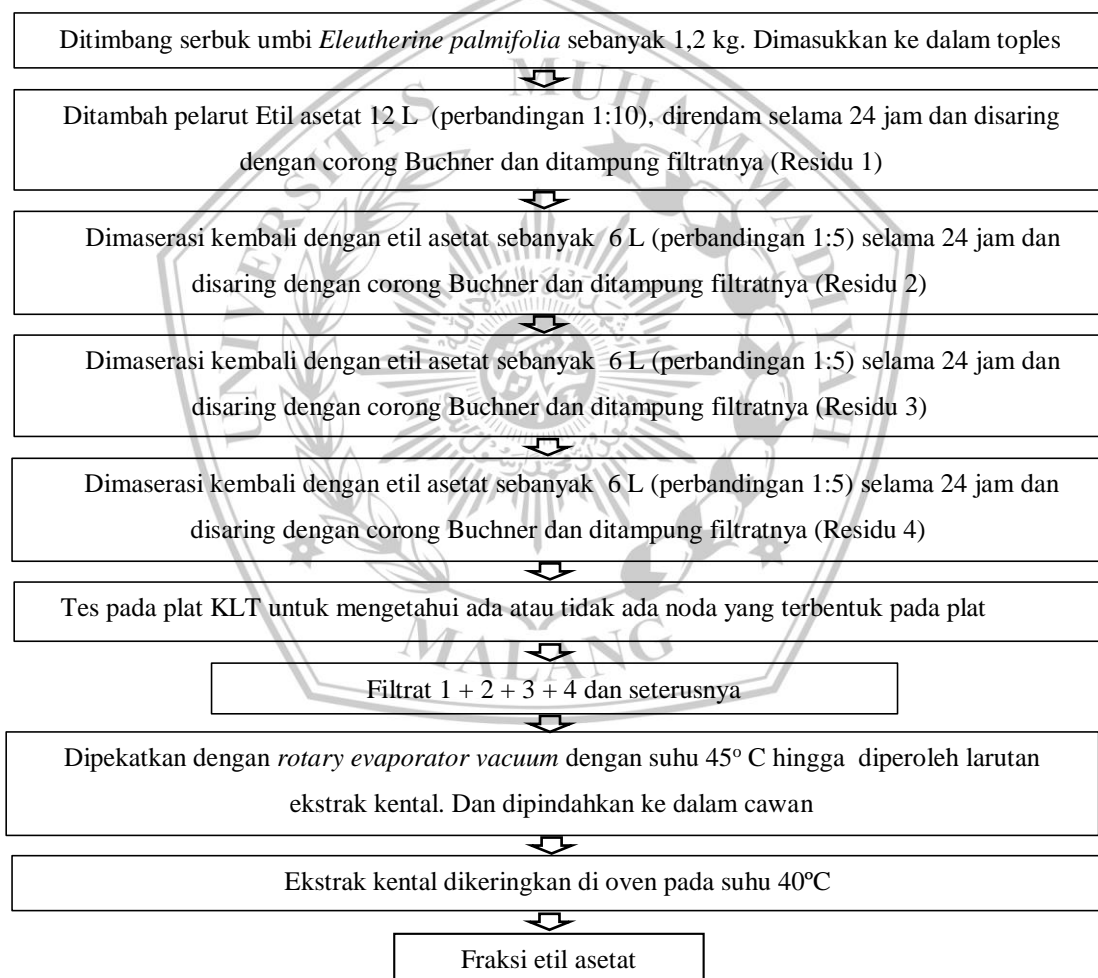
- 1) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* 1,2 kg ditambahkan dengan pelarut etil asetat 12 L (perbandingan 1:10), rendam selama 24 jam, kemudian disaring dengan corong Buchner tampung filtratnya. (Filtrat 1 dan residu 1).
- 2) Residu 1 dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 6 L (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Disaring dan tampung filtratnya (filtrat 2 dan residu 2), hingga seterusnya dilakukan dengan metode yang sama secara berulang sampai pada filtrat tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut etil asetat.
- 3) Maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada umbi dayak tertarik oleh pelarut etil asetat. Ditandai dengan tes pada plat KLT menunjukkan tidak ada noda yang terbentuk.
- 4) Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental.
- 5) Kemudian dipindahkan ekstrak kental ke cawan porselen. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C sampai berat ekstrak stabil.

Pada sesi kedua sebagai berikut :

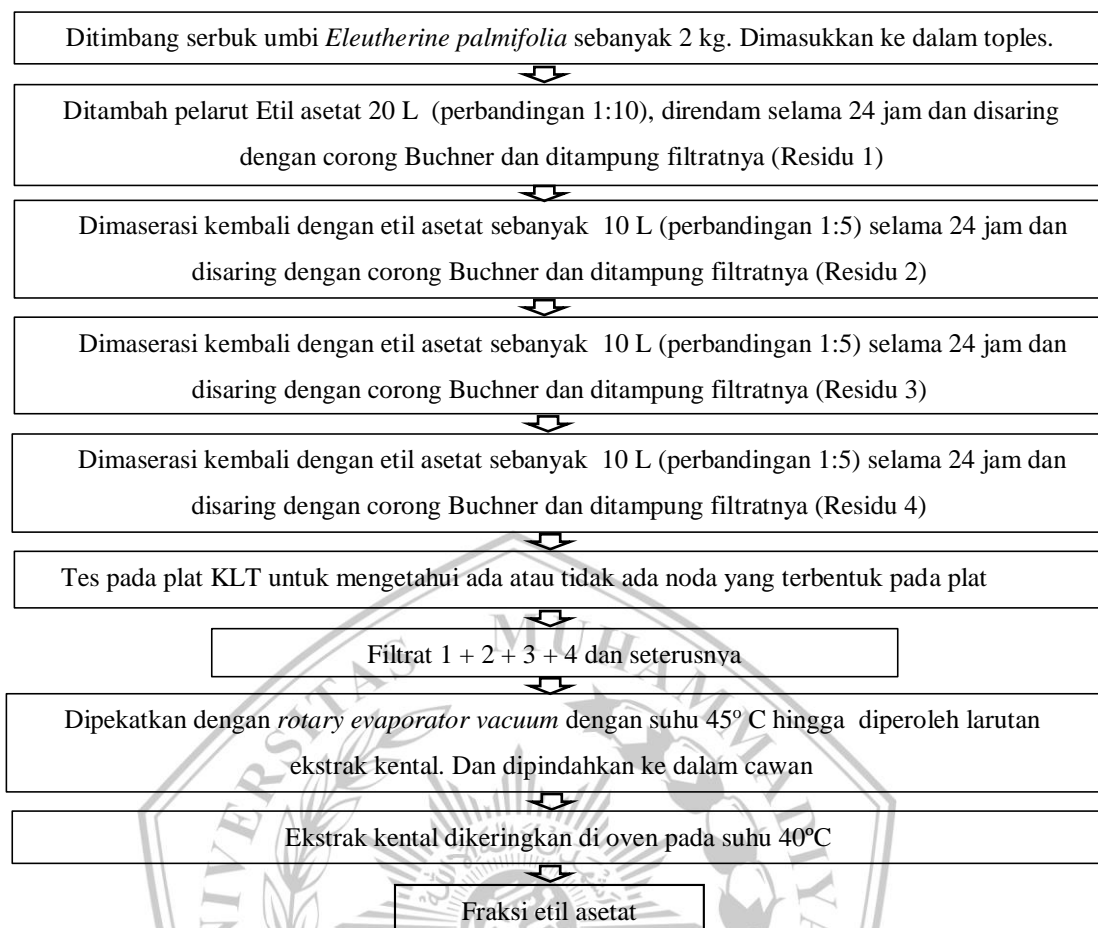
- 1) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* sebanyak 2 kg ditambahkan dengan pelarut etil asetat sebanyak 20 L (perbandingan 1:10), direndam selama 24 jam, kemudian disaring dengan corong Buchner tampung filtratnya. (Filtrat 1 dan residu 1).
- 2) Residu 1 dimaserasi kembali dengan etil asetat sebanyak 10 L (perbandingan 1:5), direndam selama 24 jam. Saring dan tampung filtratnya (filtrat 2 dan

residu 2), hingga seterusnya dilakukan dengan metode yang sama secara berulang sampai pada filtrat tidak lagi menunjukkan ada komponen yang tertarik dengan pelarut asetat.

- 3) Maserasi dilakukan hingga semua senyawa yang terdapat pada umbi *Eleutherine palmifolia* tertarik oleh pelarut etil asetat. Ditandai dengan tes pada plat KLT menunjukkan tidak ada noda yang terbentuk.
- 4) Filtrat dikumpulkan lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 45° C sampai diperoleh larutan ekstrak kental.
- 5) Kemudian dipindahkan ekstrak kental ke cawan porselen. Ekstrak kental dikeringkan di oven pada suhu 40°C.



Gambar 4.2 Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji Dengan Pelarut Etil Asetat Sesi Pertama



Gambar 4.3 Bagan Alir Proses Ekstraksi Bahan Uji Dengan Pelarut Etil Asetat Sesi Kedua

4.8.4 Pemisahan Senyawa Dengan KLT

Ditimbang 50 mg ekstrak etil asetat, diletakkan pada wadah tertutup rapat dan dilarutkan dengan 1 ml etil asetat. Totolkan pada lempeng KLT sebanyak satu kapiler (5µl), kemudian dilakukan eluasi menggunakan berbagai macam fase gerak.

Pelarut N-heksan, etil asetat dan kloroform dipilih sebagai eluen karena viskositasnya yang rendah, stabil, serta kombinasi keduanya dapat meningkatkan selektifitas bahan yang akan dipisahkan khususnya yang bersifat semipolar. Tujuan dipilih kombinasi eluen sendiri yaitu agar hasil yang diberikan tidak bervariasi.

- 1) Fase diam : silica gel TLC 60 F₂₅₄
- 2) Optimasi fase gerak
 - a. Etil asetat : N-heksan (4 : 6)
 - b. Etil asetat : N-heksan (7 : 3)
 - c. Etil asetat : Kloroform (5 : 5)

d. Etil asetat : Kloroform (3:7)

e. Etil asetat : Kloroform (7:3)

4.8.5 Identifikasi Komponen Senyawa

Senyawa yang sudah di pisahkan dengan menggunakan metode KLT selanjutnya dilakukan identifikasi terhadap senyawa metabolit yang terkandung di dalam ekstrak umbi *Eleutherine palmifolia* fraksi etil asetat dengan penampak noda sebagai berikut :

- Alkaloid : Pereaksi dragendorff (noda berwarna coklat atau jingga).
 Flavonoid : Uap amonia (noda berwarna kuning atau kuning kecoklatan).
 Polifenol : Pereaksi FeCl_3 10% (noda berwarna hitam).
 Terpenoid : Pereaksi anisaldehyd (noda berwarna ungu atau ungu merah).
 Polifenol : Besi (III) Klorida 1% (noda berwarna hitam).
 Antrakinon : Larutan kalium hidroksida 10% dalam etanol (noda berwarna jingga atau merah).

4.8.6 Persiapan Pembuatan Konsetrasi Larutan Uji

Mengacu pada penelitian sebelumnya yang mana telah diketahui konsentrasi umbi bawang dayak sebagai antibakteri. Maka dari itu persiapan pembuatan konsentrasi larutan uji fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* menggunakan perbandingan konsentrasi untuk bakteri *Shigella dysenteriae* sebagai berikut :

Konsentrasi 1 : Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* 80mg/ml.

Konsentrasi 2 : Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* 120mg/ml.

Konsentrasi 3 : Fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* 160 mg/ml.

4.8.7 Pembuatan Konsetrasi Larutan Uji

Tahapan pada pembuatan konstrasi larutan uji yaitu sebagai berikut :

- 1) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* ditimbang sebanyak 80 mg, ditambahkan Tween 10% (0,1 ml Tween dilarutkan dalam 1 ml aquadest steril). Diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 80 mg/ml.
- 2) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* ditimbang sebanyak 120 mg, ditambahkan Tween 10% (0,1 ml Tween dilarutkan dalam 1 ml aquadest steril). Diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 120 mg/ml.

- 3) Serbuk umbi *Eleutherine palmifolia* ditimbang sebanyak 160 mg, ditambahkan Tween 10% (0,1 ml Tween dilarutkan dalam 1 ml aquadest steril). Diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 160 mg/ml.

4.8.8 Pembuatan Media

Pada penelitian ini media yang digunakan yaitu media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan media *Mueller Hinton Broth* (MHB).

1) Pembuatan *Mueller Hinton Agar*

Di timbang bahan sebanyak 38 g (*Beef Infusion* 300 g, *Casein hydrolysate* 17,5 g dan Agar 17 g) di larutkan dengan 1000 ml aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1000 ml. Erlenmeyer diletakkan diatas *hot plate*, aduk rata hingga mendidih dan larutan media berubah warna menjadi kuning jernih. Tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil kemudian dilakukan sterilisasi metode panas basah dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Selanjutnya, media dituang pada cawan petri yang sudah steril dengan teknik aseptis di dalam LAF (Hafsan dkk., 2015).

2) Pembuatan *Mueller Hinton Broth*

Ditimbang bahan sebanyak 21 g (*Beef infusion* 2 g, *Casein hydrolysate* 17.5 g, dan *Starch* 1.5 g) dilarutkan dalam 1000 ml aquadest pada erlenmeyer dengan kapasitas 1000 ml. Erlenmeyer diletakkan diatas *hot plate*, aduk rata hingga mendidih dan larutan media berubah warna menjadi kuning jernih. Tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil kemudian dilakukan sterilisasi metode panas basah dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121° C. Selanjutnya, media dituang pada cawan petri yang sudah steril dengan teknik aseptis di dalam LAF (Hafsan dkk., 2015).

4.8.9 Pembuatan Standar Mc Farland

Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Ditambahkan H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 ml dan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 ml. Kedua campuran tersebut di kocok sampai homogen dan larutan berubah warna menjadi keruh. Mc Farland dapat dipakai sebagai standart kekeruhan suspensi bakteri sampai 10⁸ CFU/ml (Hasibuan, 2016).

4.8.10 Pewarnaan Bakteri Uji

Pewarnaan yang dilakukan pada praktikum ini yaitu merupakan pewarnaan Gram. Tujuan dilakukannya pewarnaan untuk mengetahui jenis Gram pada bakteri apakah termasuk positif atau negatif. *Object glass* yang sudah disterilkan dengan alkohol 96% di tetesi aquadest secukupnya dan tambahkan biakan bakteri yang akan dilakukan uji pewarnaan menggunakan kawat ose. Ratakan biakan bakteri pada *object glass* yang sudah di beri aquadest. Dilakukan pemanasan di atas api bunsen, lewatkan *object glass* di atasnya 2 sampai 3 kali. Setelah kering, langkah pertama ditetesi dengan pewarna Kristal Violet dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest. Kedua, ditetesi dengan pewarna Lugol dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest. Ketiga, *object glass* dibilas dengan alkohol 96% kemudian aquadest. Keempat, ditetesi dengan pewarna Safranin dan diamkan selama 1 menit kemudian bilas dengan aquadest. Keringkan *object glass* menggunakan tisu secara perlahan. Dilakukan pengamatan pada mikroskop dengan perbesaran 100×10 , bakteri yang tetap menunjukkan warna ungu setelah pemberian safranin maka termasuk dalam bakteri Gram positif. Sedangkan untuk bakteri yang menunjukkan warna merah pada saat pemberian safranin maka termasuk ke dalam bakteri Gram negatif (Hafsan dkk., 2015).

4.8.11 Pengujian Antibakteri Dengan Difusi Cakram

Beberapa tahap pengujian antibakteri dengan menggunakan difusi cakram, yaitu :

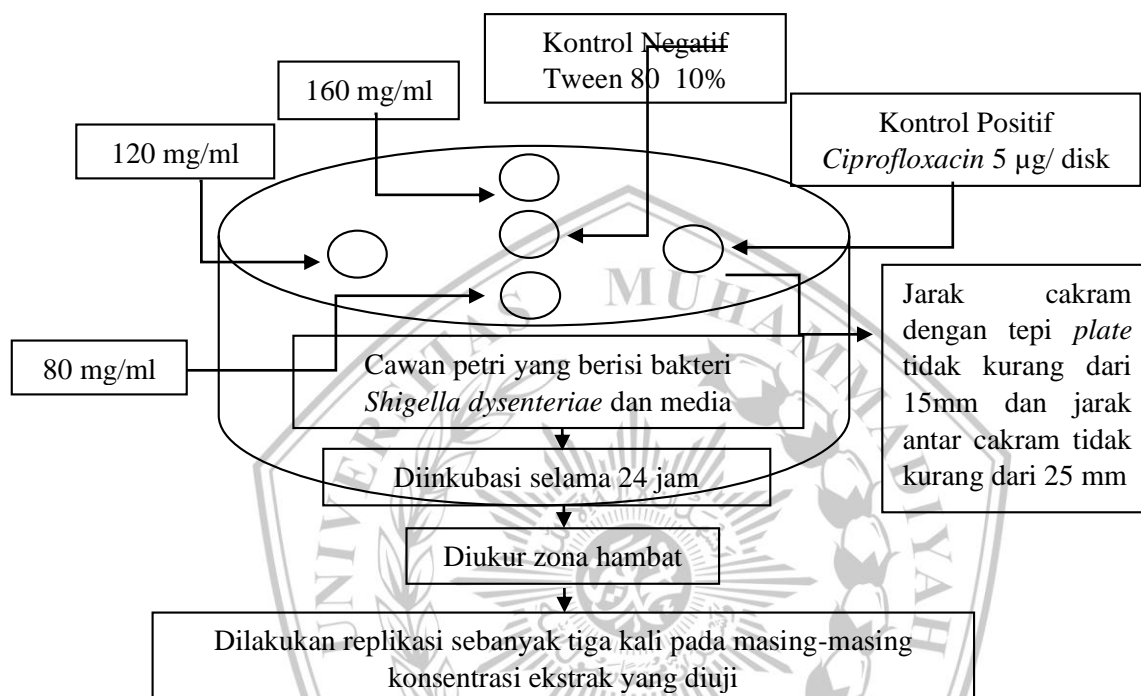
- 1) Dilakukan peremajaan bakteri dan preparasi media. Dengan cara diambil 3-4 ose bakteri dan masukkan kedalam media *Mueller Hinton Broth* (MHB) pada erlenmeyer. Setelah itu diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C dan dilakukan pengocokan dengan *shaker* berkecepatan 120 rpm. Disiapkan terlebih dahulu standar Mc. Farland dengan tingkat kekeruhan 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Setelah itu dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan teknik dilusi atau pengenceran. Diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 9 ml NaCl 0,85% sehingga didapat biakan bakteri 10^7 . Kemudian dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Jika kekeruhan sudah sama maka dilakukan pengenceran hingga didapatkan jumlah koloni bakteri yang diinginkan yakni

10⁶ CFU/ml. Suspensi bakteri tersebut diambil menggunakan kapas lidi steril dan digoreskan pada 3-4 bagian secara horizontal dan merata kemudian putar cawan 180°C kemudian ratakan.

- 2) Dilakukan cek pewarnaan Gram baik sebelum maupun sesudah peremajaan bakteri.
- 3) Pengujian bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode difusi cakram dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).
- 4) Disiapkan larutan uji masing-masing yang telah di masukkan eppendorf dengan konsentrasi 80 mg/ml (konsentrasi 1), 120 mg/ml (konsentrasi 2), 160 mg/ml (konsentrasi 3), kontrol positif (*ciprofloxacin* 5 µg) dan kontrol negatif (Tween 80 10% , aquadest steril).
- 5) Dipipet 10 µl larutan uji fraksi etil asetat umbi *Eleuterine palmifolia* pada konsentrasi 1, konsentrasi 2 dan konsentrasi 3. Letakkan kertas cakram kosong di atas kaca arloji yang berisi kombinasi larutan uji kemudian direndam selama 20 menit dengan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali, tiap selesai perendaman (sampai rendaman ke-5) dikeringkan dengan oven selama 5 menit pada suhu 37° C. Setelah perendaman ke-6 cukup diangin-anginkan di dalam LAF agar kertas cakram tidak terlalu kering. Untuk kontrol negatif perlakuannya sama dengan larutan uji, hanya saja menggunakan Tween 10% serta di oven selama 10 menit pada suhu 37° C.
- 6) Dilakukan preparasi sebanyak 3 kali.
- 7) Pada permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) diletakkan kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah berisi konsentrasi larutan uji. Untuk mendapatkan kontak yang baik antara kertas cakram dan media MHA, tekan lembut kertas cakram pada permukaannya dengan menggunakan pinset. Jarak cakram dengan tepi *plate* tidak kurang dari 15 mm. Jarak cakram dengan cakram tidak kurang dari 24 mm. Sekali cakram sudah ditempelkan pada agar, tidak boleh digeser atau dipindahkan.
- 8) Dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.
- 9) Dilakukan pengamatan setiap 24 jam untuk melihat diameter zona bening di sekitar kertas cakram. Zona hambat yang muncul dapat diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm).

4.8.12 Analisis Data

Analisis data yang dilakukan pada praktikum ini yaitu secara deskriptif. Dilakukan pengamatan ukuran pada diameter zona hambat pada daerah yang berwarna bening dari komponen senyawa yang telah dipisahkan pada fraksi etil asetat umbi *Eleutherine palmifolia* terhadap *Shigella dysenteriae*.



Gambar 4.4. Bagan Pengujian Antibakteri Dengan Difusi Cakram